

BS

Method for the fermentative production of D-pantothenic acid using coryneform bacteria

Publication number: EP1006189

Publication date: 2000-06-07

Inventor: EGGELING LOTHAR DR (DE); THIERBACH GEORG DR (DE); SAHM HERRMANN PROF DR (DE)

Applicant: DEGUSSA (DE); KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE)

Classification:

- International: A23L1/302; A61K31/197; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/09; C12N15/52; C12N15/60; C12P13/02; C12R1/15; A23L1/302; A61K31/185; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/09; C12N15/52; C12N15/60; C12P13/00; (IPC1-7): C12N1/21; C12N15/52; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/54; C12N15/60; C12N15/77; C12P13/02; C12R1/15; C12R1/15; C12R1/19

- European: C12N9/00L; C12N9/10A2; C12N9/88; C12N15/52; C12P13/02

Application number: EP19990123738 19991130

Priority number(s): DE19981055312 19981201

Also published as:

US6177264 (B1)
ZA9907407 (A)
JP2000166580 (A)
EP1006189 (A3)
DE19855312 (A1)

Cited documents:

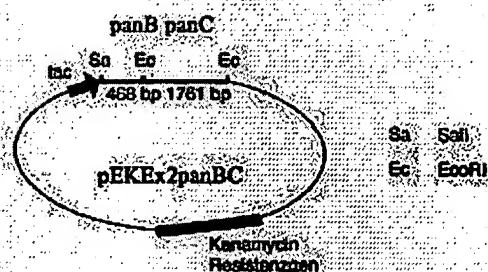
EP0590857
US5518906
EP1006192
WO0100843
WO0050624
more >>

Report a data error here

Abstract of EP1006189

Recombinant *Corynebacterium* DNA (I), present in microorganisms of the *Corynebacterium* genus and comprising at least one of the panB, panC and/or ilvD genes, is new. Recombinant *Corynebacterium* DNA (I), present in microorganisms of the *Corynebacterium* genus and comprising at least one of the (i) panB (ketopantohydroxymethyltransferase), (ii) panC (pantothenic acid synthetase), especially the panBC operon, and/or (iii) ilvD (dihydroxyacid dehydratase) genes, and comprising the fully defined 2164, 2164 and/or 2952 base pair sequences, respectively, is new. Independent claims are also included for the following: (1) microorganisms (II), especially *Corynebacterium*, transformed with one or more of (I); (2) shuttle vector pECM3ilvBNCD (III), deposited as *E. coli* DH5 alpha mcr/pECM3ilvBNCD under DSM 12457; (3) shuttle vector pEKEEx2panBC (IV), deposited as *E. coli* DH5 alpha mcr/pEKEEx3panBC under DSM 12456; and (4) a method (V) for the preparation of pantothenic acid.

Abbildung 2



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 006 189 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(21) Anmeldenummer: 99123738.9

(22) Anmeldetag: 30.11.1999

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 15/52**, C12N 15/54,
C12N 15/60, C12N 15/77,
C12P 13/02
// C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855312

(71) Anmelder:
• Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

• **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH**
52425 Jülich (DE)

(72) Erfinder:
• Eggeling, Lothar, Dr.
52428 Jülich (DE)
• Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)
• Sahm, Herrmann, Prof.Dr.
52428 Jülich (DE)

(54) **Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer Bakterien**

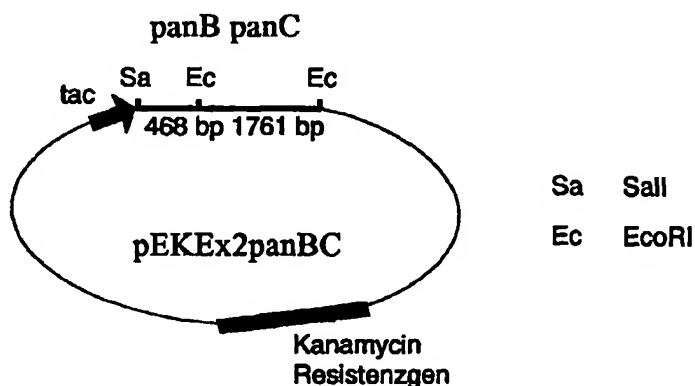
(57) Die Erfindung betrifft in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
- b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsyn-

thetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4,

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*, in denen die genannten Gene verstärkt werden.

Abbildung 2



EP 1 006 189 A2

Beschreibung

Stand der Technik

- 5 **[0001]** Die Pantothersäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.
- [0002]** Pantothersäure kann durch chemische Synthese oder biotechnologisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährlösungen hergestellt werden. Der Vorteil der biotechnologischen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der Bildung der gewünschten stereo-isomeren D-Form der Pantothersäure.
- 10 **[0003]** Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z. B. *Debaromyces castellii* können, wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothersäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei *Escherichia coli* durch Amplifikation von Pantothersäure-Biosynthesegenen mittels der Plasmide pFV3 und pFV5 die Bildung von D-Pantothersäure verbessert wird.
- 15 **[0004]** EP-A 0 590 857 betrifft Stämme von *Escherichia coli*, die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite, wie z. B. Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure etc. tragen und in einer Nährlösung, die Glucose und β -Alanin enthält, D-Pantoinsäure und D-Pantothersäure produzieren. In EP- 0 590 857 wird weiterhin beschrieben, daß durch Amplifikation von nicht näher definierten Pantothersäure-Biosynthesegenen aus *E.coli*, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, die Produktion von D-Pantoinsäure und D-Pantothersäure in *E.coli* verbessert werden kann.
- 20 **[0005]** In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß in Pantothersäure bildenden Mutanten von *Escherichia coli* durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II, einem Enzym der Valin Biosynthese, die Pantothersäure-Produktion weiter gesteigert werden kann.

Aufgabe der Erfindung

- 25 **[0006]** Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothersäure mit Hilfe coryneformer Bakterien bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 30 **[0007]** Das Vitamin Pantothersäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran verbesserte Verfahren zur Herstellung von Pantothersäure bereitzustellen.
- Wenn im folgenden Text D-Pantothersäure oder Pantothersäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht nur die freie Säure, sondern auch die Salze der D-Pantothersäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.
- 35 Gegenstand der Erfindung sind in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

- 40 a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
 b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls
 c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4.

- 45 **[0008]** Gegenstand der Erfindung sind ebenso replizierbare DNA gemäß dem genannten Anspruch 1 mit:

- 50 (i) den Nucleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No.1, SEQ-ID-No.4,
 (ii) mindestens einer dieser Sequenzen, die den jeweiligen Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entsprechen oder
 (iii) mindestens einer dieser Sequenzen, die mit den zu jeweiligen Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisieren und gegebenenfalls
 (iiii) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

- 55 **[0009]** Ebenso werden beansprucht coryneforme Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*, transformiert durch die Einführung einer oder mehrer replizierbarer DNA-Stücke.
 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothersäure unter Verwendung, insbesond-

ere diese Säure bereits produzierender coryneformer Bakterien, in denen die Gene panB und panC einzeln oder kombiniert miteinander gegebenenfalls kombiniert mit einer Defektmutation im ilvA-Gen oder einer Verstärkung der Gene ilvBN, ilvC oder ilvD verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0010] Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man z. B. die Kopienzahl des(der) Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0011] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantothenensäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen, insbesondere aus Glucose oder Saccharose. Es handelt sich um coryneforme Bakterien z. B. der Gattungen *Corynebacterium* oder *Arthrobacter*. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt, ist Aminosäuren zu bilden. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 und davon abgeleitete Stämme.

[0012] Die Erfinder fanden heraus, dass nach Verstärkung, insbesondere Überexpression, der neu isolierten D-Pantothenatbiosynthesegene panB und panC einzeln oder gemeinsam (panBC-Operon) aus *Corynebacterium glutamicum*, die für die Enzyme Ketopantoathydroxymethyltransferase und Pantothenatesynthetase kodieren, in verbesserter Weise D-Pantothenat produziert wird.

[0013] Die Erfinder haben weiter festgestellt, daß eine verstärkte Expression des neuen Valinbiosynthesegens ilvD aus *Corynebacterium glutamicum*, welches für das Enzym Dihydroxysäuredehydratase kodiert, zur erhöhten D-Pantothenatbildung beiträgt. Erfindungsgemäss bewirken neben diesem Gen auch die verstärkte Expression der ilvBN-Gene, die für das Enzym Acetohydroxysäuresynthase kodieren, und des ilvC-Gens, das für das Enzym Isomeroereduktase kodiert, in *Corynebacterium glutamicum* eine erhöhte D-Pantothenatbildung.

[0014] Zur Erzielung einer Verstärkung (Überexpression) erhöht man z. B. die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder mutiert die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen D-Pantothenatbildung zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte liegen dabei entweder in Plasmidvektoren mit unterschiedlicher Kopienzahl vor oder sind im Chromosom integriert und amplifiziert. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) oder im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0015] Zur Isolierung der Gene panB und panC aus *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC19 (Norlander et al., 1983, Gene, 26: 101-106) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc_r, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde.

[0016] Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) eingebaut. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp z.B. eine Auxotrophie hervorruft. Die Indikatorstämme bzw. Mutanten sind aus publizierten Quellen oder Stammsammlungen erhältlich oder werden gegebenenfalls selbst hergestellt. Im Rahmen

der vorliegenden Erfindung ist die *E. coli* Mutante DV39 (Vallari und Rock, Journal of Bacteriology 1985, 164:136-142), die eine Mutation im *panC*-Gen trägt, von besonderem Interesse. Ein anderes Beispiel für eine Pantothensäure-bedürftige *E. coli* Mutante ist der Stamm SJ2, der eine Mutation im *panB*-Gen trägt und vom Genetic Stock Center der Yale University (New Haven, Connecticut, USA) bezogen werden kann. Ein weiteres Beispiel ist die im Rahmen der vorliegenden Erfindung isolierte *C. glutamicum* Mutante R127/7, die in dem für die Dihydroxysäuredehydratase kodierendem *ilvD*-Gen defekt ist. Nach Transformation des Indikatorstammes wie z.B. der *panB*-Mutante SJ2 mit einem rekombinanten Plasmid, welches das interessierende Gen wie z.B. das *panB*-Gen trägt, und Expression des betreffenden Gens, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden Eigenschaft wie z.B. der Pantothensäure-Bedürftigkeit prototroph.

[0017] Das dergestalt isolierte Gen bzw. DNA-Fragment kann durch Bestimmung der Sequenz, wie z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben, charakterisiert werden.

[0018] Auf diese Weise wurde die neue für die Gene *panB* und *panC* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurden aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Enzyme abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *panB*-Genproduktes nämlich der Ketopantoathydroxymethyltransferase und in SEQ ID NO 3 die sich ergebende Aminosäuresequenz des *panC*-Genproduktes nämlich der Pantothensynthetase dargestellt. Weiterhin wurde auf diese Weise die neue für das *ilvD*-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 4 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. In SEQ ID NO 5 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *ilvD*-Genproduktes nämlich der Dihydroxysäuredehydratase dargestellt.

[0019] Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 4 durch einen degenerierten genetischen Code ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 4 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 und/oder SEQ ID NO 5 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

[0020] Das dergestalt charakterisierte Gen kann anschließend einzeln oder in Kombination mit anderen in einem geeigneten Mikroorganismus zur Expression gebracht werden. Eine bekannte Methode Gene zu exprimieren bzw. überzuexprimieren besteht darin diese mit Hilfe von Plasmidvektoren zu amplifizieren, die überdies mit Expressionssignalen ausgestattet sein können. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für *Corynebacterium glutamicum* kommen z.B. die Vektoren pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) oder pEKEx2 (Eikmanns et al. Microbiology 140: 1817-1828 (1994) oder pECM2 (Jäger et al. Journal of Bacteriology 174(16): 5462-5465 (1992)) in Frage. Beispiele für derartige Plasmide sind pEKEx2panBC und pECM3ilvBNCD, die in den Stämmen DH5 α mcrr/pEKEx2panBC und DH5 α mcrr/pECM3ilvBNCD enthalten sind. Plasmid pEKEx2panBC ist ein *E. coli*/C. *glutamicum* Pendelvektor der die Gene *panB* und *panC* trägt. Plasmid pECM3ilvBNCD ist ein *E. coli*/C. *glutamicum* Pendelvektor der neben dem *ilvD*-Gen weiterhin die Gene *ilvBN* und *ilvC* trägt.

[0021] Die Erfinder haben weiterhin gefunden, dass sich die Verstärkung der Gene *panB* und *panC* einzeln, gemeinsam oder in Kombination mit den Genen *ilvBN*, *ilvC* und *ilvD* in solchen Mikroorganismen vorteilhaft auswirkt, die eine reduzierte Synthese der Aminosäuren Threonin und Isoleucin aufweisen. Diese reduzierte Synthese kann durch Abschwächung oder Ausschaltung der entsprechenden Biosyntheseenzyme bzw. ihrer Aktivitäten erreicht werden. Hierfür kommen zum Beispiel die Enzyme Homoserindehydrogenase, Homoserinkinase, Threoninsynthase oder auch Threonindehydratase in Frage. Eine Möglichkeit Enzyme und deren Aktivitäten abzuschwächen oder auszuschalten sind Mutageneseverfahren.

[0022] Hierzu gehören ungerichtete Verfahren, die chemische Reagenzien wie z.B. N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin oder auch UV-Bestrahlung zur Mutagenese benutzen, mit anschließender Suche der gewünschten Mikroorganismen auf Bedürftigkeit für L-Threonin oder L-Isoleucin. Verfahren zur Mutationsauslösung und Mutantensuche sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

[0023] Weiterhin gehören hierzu gerichtete rekombinante DNA-Techniken. Mit Hilfe dieser Methoden kann zum Beispiel das für die Threonindehydratase kodierende *ilvA*-Gen im Chromosom deletiert werden. Geeignete Methoden dazu sind bei Schäfer et al. (Gene (1994) 145: 69-73) oder auch Link et al. (Journal of Bacteriology (1998) 179: 6228-6237) beschrieben. Auch können nur Teile des Gens deletiert werden, oder auch mutierte Fragmente des Threonindehydratasesegens ausgetauscht werden. Durch Deletion oder Austausch wird so ein Verlust oder eine Reduktion der Threonindehydrataseaktivität erreicht (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842; Morbach et al., (1996) Applied Microbiology and Biotechnology 45: 612-620). Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der *C. glutamicum* Stamm ATCC13032 Δ *ilvA*, der eine Deletion im *ilvA*-Gen trägt.

[0024] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantothersäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0025] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantothersäure-Produktion Vorstufen der Pantothersäure wie z. B. Aspartat, β -Alanin, Ketolsovalerat, Ketopantoat, Pantoat und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0026] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasgemischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 50°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothersäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0027] Die Konzentration an gebildeter Pantothersäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden. Zur mikrobiologischen Bestimmung von Pantothersäure wird gebräuchlicherweise der Stamm *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 eingesetzt (U.S. Pharmacopeia 1980; AOAC International 1980). Darüberhinaus werden auch andere Testorganismen, wie z.B. *Pediococcus acidilactici* NCIB6990 zur mikrobiologischen Bestimmung von Pantothenatkonzentrationen eingesetzt (Sollberg and Hegna; Methods in Enzymology 62, 201-204 (1979)).

[0028] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- *Escherichia coli* K12 Stamm DH5 α mcr/pEKEx2panBC als DSM12456
- *Escherichia coli* K12 Stamm DH5 α mcr/pECM3ilvBNCD als DSM12457
- *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Δ *ilvA* als DSM12455

Beispiele

[0029] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Klonierung, Sequenzierung und Expression der Gene der Pantothenatbiosynthese panB und panC aus *C. glutamicum*

5 1. Klonierung des panB- und des panC-Gens

[0030] Chromosomale DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert und mit der Restriktionsendonuklease Sau3A geschnitten. Nach geelektrophoretischer Auftrennung wurden DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 3 bis 7 kb bzw. von 9 bis 20 kb extrahiert und
 10 nachfolgend in die singuläre BamHI Schnittstelle des Vektors pBR322 ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mc^r (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 87 (1990) 4645-4649) transformiert (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166 (1983) 557-580). Inserttragende Kolonien wurden anhand ihrer Tetracyclinsensitivität nach Überimpfen auf 10 μ g/ml Tetracyclin enthaltende LB-Agarplatten identifiziert. Durch Plasmidpräparationen (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold
 15 Spring Harbour Laboratory Press) von vereinigten Klonen wurden 8 Gruppen, welche je 400 Plasmide mit einer Insertgröße von 9 bis 20 kb und 9 Gruppen, welche je 500 Plasmide mit einer Insertgröße von 3 bis 7 kb enthielten isoliert. Die *E. coli* panB Mutante SJ2 (Cronan et al. 1982, Journal of Bacteriology 149: 916-922) wurde mit dieser Genbank mittels Elektroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356) transformiert. Die Transformationsansätze wurden direkt auf CGXII-Medium mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603)
 20 ausplattiert. Von Klonen, welche in der Lage waren ohne Pantothenatsupplementation zu wachsen, wurde Plasmid-DNA isoliert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Bei 8 Plasmiden konnte durch Retransformation die Fähigkeit, den panB-Defekt der *E. coli* Mutante SJ2 heterolog zu komplementieren, bestätigt werden.

[0031] Mit diesen 8 Plasmiden wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt. Einer der untersuchten Plasmidvektoren, im Folgendem pUR1 genannt enthielt ein Insert von 9,3 kb Länge (Abbildung 1). Die Transformation der *E. coli* panC Mutante DV39 (Vallari und Rock 1985, Journal of Bacteriology 164: 136-142) ergab, daß der Vektor pUR1 ebenfalls in der Lage war den panC Defekt dieser Mutante zu komplementieren.

2. Sequenzierung des panB- und des panC-Gens

[0032] Ein 2,2 kb großes Fragment des Inserts (Abbildung 1) von pUR1 wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. sequenziert (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden zunächst mittels Exonuklease III Subklone erzeugt, die mit Hilfe von Standard Primern (Universal und reverse primer der Firma Boehringer Mannheim, Deutschland) sequenziert wurden.
 35 Die geelektrophoretische Analyse der Sequenzierungsansätze erfolgte mit dem automatischem Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserastern. Ein offenes Leseraster von 813 bp Länge, das als panB-Gen identifiziert wurde, kodiert für ein Polypeptid von 271 Aminosäuren und ist
 40 als SEQ ID NO 2 wiedergegeben. Das zweite offene Leseraster, das als panC-Gen identifiziert wurde, umfaßt 837 Basenpaare. Es kodiert für ein Polypeptid von 279 Aminosäuren, das als SEQ ID NO 3 wiedergegeben ist.

3. Expression des panB- und des panC-Gens

[0033] Die Gene panB und panC wurden in den *C. glutamicum* Expressionsvektor pEKEx2 kloniert (Eikmanns et al. 1994, Microbiology 140: 1817-1828 (1994)), in welchem die beiden Gene unter der Kontrolle des starken, durch IPTG induzierbaren tac-Promotors vorliegen. Die Klonierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde mittels PCR der Anfang des panB Gens amplifiziert. Hierzu wurde mit Hilfe eines entsprechenden Primers 19 bp vor dem Startcodon von panB eine Sall-Schnittstelle eingefügt (Primer 1: 5'GATCGTCGACCATCATCTATACTCATGCCC 3'). Der zweite Primer wurde so gewählt, daß die panB interne EcoRI Schnittstelle im amplifizierten Fragment enthalten war (Primer 2: 5'ACCCG ATGTGGCCGACAACC 3'). Die PCR wurde mit einer Annealingtemperatur von 62°C und dem Plasmid pUR1 als Matrize nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)) durchgeführt. Das resultierende 468 bp große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen Sall und EcoRI geschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pEKEx2 ligiert. Mit dem
 50 Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mc^r transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 α mc^r/pEKEx2panB' wurde der Vektor pEKEx2panB' isoliert.

[0034] Aus dem Plasmid pUR1 wurde nun ein 1761 bp großes, die zweite Hälfte des panBC-Clusters enthaltendes, EcoRI Fragment mittels Restriktionsverdau ausgeschnitten. Dieses wurde in den schon das panB PCR-Produkt enthal-

tenden, zuvor mit EcoRI linearisierten pEKEx2panB' Vektor kloniert. Mit dem entsprechenden Ligationsansatz wurde der E. coli Stamm DH5 α mc^r transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 α mc^r/pEKEx2panBC wurde der Vektor pEKEx2panBC (Abbildung 2) isoliert, in dem das panBC-Gencluster unter der Kontrolle des lac-Promotors vorliegt.

5 Beispiel 2

Klonierung und Sequenzierung des für die Dihydroxysäuredehydratase kodierenden ilvD-Gens aus C. glutamicum

1. Isolierung einer ilvD Mutante von C. glutamicum

10

[0035] Der Stamm C. glutamicum R127 (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) wurde mit N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin mutagenisiert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Dazu wurden 5 ml einer über Nacht angezogenen C. glutamicum Kultur mit 250 μ l N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (5 mg/ml Dimethylformamid) versetzt und 30 Minuten bei 30°C und 200 Upm inkubiert (Adelberg 1958, Journal of Bacteriology 76: 326). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit steriler NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Durch Replikaplatting auf Minimalmediumplatten CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), wurden Mutanten isoliert, die nur bei Zugabe von L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin (je 0,1 g/l) wuchsen.

15

[0036] Die Enzymaktivität der Dihydroxysäuredehydratase wurde im Rohextrakt dieser Mutanten bestimmt. Dazu wurden die Klone in 60 ml LB-Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer gewaschen und im selben Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels 10 minütiger Ultraschallbehandlung (Branson-Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA). Anschließend wurden die Zelltrümmer durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt in den Enzymtest eingesetzt. Der Reaktionsansatz des Enzymtests enthielt 0,2 ml 0,25 M Tris/HCl, pH 8, 0,05 ml Rohextrakt, und 0,15 ml 65 mM α , β -Dihydroxy- β -methylvalerat. Die Testansätze wurden bei 30 °C inkubiert, nach 10, 20 und 30 Minuten 200 μ l Proben genommen und deren Ketomethylvaleratkonzentration mittels HPLC-Analytik bestimmt (Hara et al. 1985, Analytica Chimica Acta 172: 167-173). Wie Tabelle 1 zeigt, weist der Stamm R127/7 keine Dihydroxysäuredehydrataseaktivität auf, wogegen die Isomero-reduktase und Acetohydroxysäuresynthase Aktivitäten als weitere Enzyme der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren noch vorhanden sind.

30

Tabelle 1

35

Spezifische Aktivitäten (μ mol/min und mg Protein) verschiedener Enzyme in C. glutamicum Stämmen			
Stamm	Dihydroxysäure dehydratase	Isomero reduktase	Acetohydroxysäure synthase
R127	0,003	0,05	0,07
R127/7	0,000	0,06	0,09

40

2. Klonierung des ilvD-Gens von C. glutamicum

[0037] Chromosomale DNA aus C. glutamicum R127 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A (Boehringer Mannheim) gespalten und durch Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) aufgetrennt. Die Fraktion mit dem Fragmentgrößenbereich von etwa 6-10 kb wurde zur Ligation mit dem Vektor pJC1 (Cremer et al., Molecular and General Genetics 220 (1990) 478-480) eingesetzt. Der Vektor pJC1 wurde hierzu mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurden mit 20 ng der genannten Fraktion der chromosomalen DNA ligiert und damit die Mutante R127/7 durch Elektroporation (Haynes und Britz, FEMS Microbiology Letters 61 (1989) 329-334) transformiert. Die Transformanten wurden auf die Fähigkeit getestet auf CGXII Agarplatten ohne Zugabe der verzweigtkettigen Aminosäuren wachsen zu können. Von über 5000 getesteten Transformanten wuchsen nach Replikaplatting und zweitägiger Inkubation bei 30°C 8 Klone auf Minimalmediumplatten. Von diesen Klonen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben durchgeführt. Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA ergaben, daß in allen 8 Klonen dasselbe Plasmid, im Folgendem pRV genannt, enthalten war. Das Plasmid trägt ein Insert von 4,3 kb und wurde durch Retransformation auf seine Fähigkeit die ilvD-Mutante R127/7 zu komplementieren getestet. Durch Subklonierung

55

wurde der für die Komplementation der Mutante R127/7 verantwortliche Bereich auf ein 2,9 kb *ScaI/XhoI*-Fragment eingegrenzt.

3. Sequenzierung des *ilvD*-Gens

[0038] Die Nukleinsäuresequenz des 2,9 kb *ScaI/XhoI*-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. durchgeführt (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Dabei wurde der Auto-Read Sequencing kit verwendet (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischem Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als ID SEQ NO 4 wiedergegeben. Die Analyse ergab ein offenes Leseraster von 1836 Basenpaaren, das als *ilvD*-Gen identifiziert wurde und für ein Polypeptid von 612 Aminosäuren kodiert, das als SEQ ID NO 5 wiedergegeben ist.

Beispiel 3

Konstruktion einer *ilvA* Deletionsmutante von *C. glutamicum*

[0039] Der Einbau einer Deletion in das *ilvA*-Gen von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde mit dem bei Schäfer et al. (Gene 145: 69-73 (1994)) beschriebenen System zum Genaustausch durchgeführt. Zur Konstruktion des Inaktivierungsvektors pK19mobsacB Δ *ilvA* wurde zunächst aus dem auf einem *EcoRI*-Fragment im Vektor pBM21 (Möckel et al. 1994, Molecular Microbiology 13: 833-842) vorliegenden *ilvA*-Gen ein internes 241 bp *BglII*-Fragment entfernt. Hierzu wurde der Vektor mit *BglII* geschnitten und, nach Abtrennung des *ilvA* internen *BglII*-Fragmentes mittels Agarosegelelektrophorese, religiert. Anschließend wurde aus dem Vektor das unvollständige Gen als *EcoRI*-Fragment isoliert und in den mit *EcoRI* linearisierten Vektor pK19mobsacB (Schäfer 1994, Gene 145: 69-73) ligiert. Der erhaltene Inaktivierungsvektor pK19mobsacB Δ *ilvA* wurde durch Transformation in den *E. coli* Stamm S 17-1 eingebracht (Hanahan 1983, Journal of Molecular Biology 166: 557-580) und per Konjugation nach *C. glutamicum* ATCC13032 transferiert (Schäfer et al. 1990, Journal of Bacteriology 172: 1663-1666). Es wurden Kanamycin-resistente Klone von *C. glutamicum* erhalten, bei denen der Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag. Um auf die Excision des Vektors zu selektionieren, wurden Kanamycin-resistente Klone auf Saccharose-haltigem LB-Medium ((Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press)) mit 15 g/l Agar, 2% Glucose/10% Saccharose) ausplattiert und Kolonien erhalten, welche den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder verloren haben (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465). Durch Überimpfen auf Minimalmediumplatten (Medium CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175 (1993) 5595-5603)) mit und ohne 2 mM L-Isoleucin, bzw. mit und ohne 50 μ g/ml Kanamycin wurden 36 Klone isoliert, welche durch die Excision des Vektors Kanamycin sensitiv und Isoleucin auxotroph waren und bei denen nun das unvollständige *ilvA* Gen (Δ *ilvA*-Allel) im Genom vorlag. Einer dieser Klone wurde als Stamm ATCC13032 Δ *ilvA* bezeichnet und weiter verwendet.

Beispiel 4

Expression der Gene *ilvBN*, *ilvC* und *ilvD* in *C. glutamicum*

[0040] Die Gene der Acetohydroxysäuresynthase (*ilvBN*) und der Isomeroxydase (*ilvC*) (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116 und Keilhauer et al. 1993, Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) und der Dihydroxysäuredehydratase (*ilvD*) (Beispiel 2) wurden zur Expression in den Vektor pECM3 kloniert. Der Vektor pECM3 ist ein Derivat von pECM2 (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465), das durch Deletion des ca. 1 kbp langen *BamHI/BglII* DNA-Fragmentes entstand, welches das Kanamycinresistenzgen trägt.

[0041] In dem Vektor pKK5 (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116) lagen die Gene *ilvBNC* bereits im Vektor pJC1 (Cremer et al. 1990, Molecular and General Genetics 220: 478-480) kloniert vor. Aus diesem wurde ein 5,7 kb *XbaI*-*ilvBNC*-Fragment isoliert und zusammen mit einem, das *ilvD*-Gen enthaltende, 3,1 kb-*XbaI* Fragment des Vektors pRV in den mit *XbaI* linearisierten Vektor pECM3 eingebracht. Der Ligationsansatz wurde hierbei in den *E. coli* Stamm DH5 α mcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 α mcr/pECM3*ilvBNCD* wurde das Plasmid pECM3*ilvBNCD* (Abbildung 3) erhalten.

[0042] Mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Chloramphenicolresistenz wurde das Plasmid pECM3*ilvBNCD* in den Stamm ATCC13032 Δ *ilvA* eingebracht und der Stamm ATCC13032 Δ *ilvA*/pECM3*ilvBNCD* erhalten. Weiterhin wurde mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Kanamycinresistenz das Plasmid pEKEx2panBC in den Stamm ATCC13032 und in den Stamm ATCC13032 Δ *ilvA* eingebracht und die Stämme ATCC13032/pEKEx2panBC und

ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC erhalten. In den Stamm ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD wurden mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Kanamycin und Chloramphenicol die Plasmide pEKEx2panBC und pEKEx2 eingebracht. Auf diese Weise entstanden die Stämme ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 und ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC.

5

Beispiel 5

Konstruktion einer Pantothen säure bedürftigen panC-Mutante von *C. glutamicum*

10 **[0043]** Es wurde mit Hilfe des Inaktivierungsvektors pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145: 69-73) eine *C. glutamicum* R127 panC Mutante erzeugt.

[0044] Zur Konstruktion des panC-Inaktivierungsvektors wurde zunächst ein 168 bp großes, zentrales Fragment des panC-Gens (Nukleotid 265-432 des 837 bp umfassenden Gens) von *C. glutamicum* mittels der Polymersasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Matrize diente hier der Vektor pUR1 (s. Beispiel 6); als Primer wurden die beiden
15 20mere Primer 1 und Primer 2 eingesetzt: Primer 1 5' GTTCGCACCCGATGTGGAGG 3', Primer 2 5' ATGCACGAT-CAGGGCGCACC 3'. Die PCR wurde nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit einer Annealingtemperatur von 55°C durchgeführt. Das erhaltene Fragment wurde nach Zwischenklonierung in die SmaI Schnittstelle des Vektors pUC18, als EcoRI/SalI Fragment gerichtet in den Inaktivierungsvektor pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145: 69-73) ligiert. Der so erhaltene Vektor pK18mob'panC' wurde
20 zur Transformation des *E. coli*-Stammes S 17-1 benutzt und nachfolgend per Konjugation in *C. glutamicum* R127 eingebracht. Durch Selektion auf Kanamycinresistenz wurden so Klone von *C. glutamicum* R127 erhalten, bei denen der Integrationsvektor durch ein homologes Rekombinationsereignis ins panC-Gen integriert ist. Der so erhaltene Stamm R127panC::pK18mob'panC' ist zur D-Pantothenatbestimmung geeignet.

25 Beispiel 6

Quantitative Bestimmung von D-Pantothenat

[0045] Zur quantitativen Bestimmung von D-Pantothenat wurde die *C. glutamicum* panC Mutante R127panC::pK18mob'panC' konstruiert (siehe Beispiel 5), deren Wachstum direkt von der D-Pantothenat Konzentration des Mediums abhängig ist. Dieser Stamm ist Pantothen säure auxotroph und zeigt bei Supplementation mit β-Alanin und D-Pantoat kein Wachstum.

[0046] Zur Bestimmung von Pantothenat mit diesem Indikatorstamm wurde CGXII-Medium (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) als Testmedium eingesetzt. Dazu wurden je 3 ml 4/3 fach konzentriertes
35 CGXII-Medium in einem Inkubationsröhrchen (Falcon 2057, Becton and Dickinson, New Jersey, USA) mit 1 ml Pantothen säure-haltiger, steriler Eich- oder Probelösung versetzt und mit dem Indikatorstamm inokuliert. Als Inokulum wurden jeweils 60 µl einer Glyzerinkultur des Indikatorstammes eingesetzt. Nach 40 stündiger Inkubation bei 30°C wurde die Zelldichte (OD₆₀₀) (Novaspec 4049 Spectrophotometer, LKB Biochrom, Cambridge, GB) der Testansätze bestimmt und mittels einer Eichkurve die Pantothen säurekonzentration ermittelt. Der Stamm weist bis zu einer Konzentration von
40 25 µg/l eine lineare Abhängigkeit des Wachstums von der Pantothenatkonzentration auf, bei einer optischen Dichte von 0,5 bis 10. Zur Herstellung der Glyzerinkultur des Indikatorstammes wurde dieser Stamm auf unsupplementiertem CGXII-Medium 24 Stunden inkubiert (Aushungerung an D-Pantothenat). 1050 µl der Kultur wurden anschließend mit 700 µl Glyzerin versetzt. Von dieser bei -70°C zwischengefrorenen Glyzerinkultur wurden 60 µl zu Bestimmung von D-Pantothenat, wie zuvor beschrieben benutzt. Als Referenz wurde Na-Pantothenat verwendet, das von der Firma Sigma
45 (Deisenhofen, Deutschland) bezogen wurde.

Beispiel 7

Produktion von D-Pantothenat mit verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen

50

[0047] Zur Untersuchung ihrer Pantothenatbildung wurden die Stämme ATCC13032, ATCC13032/pEKEx2panBC, ATCC13032ΔilvA und ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) für 14 Stunden bei 30°C vorkultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD₆₀₀ von 0,5 betrug. Das
55 Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al., (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) beschriebenen Medium, enthielt aber zusätzlich 2 mM L-Isoleucin. Das von Keilhauer et al. beschriebene Medium CgXII ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Zusammensetzung des Mediums CGXII	
Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
$\text{Mg}_2\text{O}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfon- säure	42 g/L
CaCl_2	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
CuSO_4	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotin (pH7)	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protokatechusäure	0,03 mg/L

[0048] Bei der Kultivierung der Stämme ATCC13032/pEKEx2panBC und Stammes ATCC13032 Δ ilvA/pEKEx2panBC wurde das Medium nach 5 Stunden zusätzlich mit 1 mM Isopropylthio- β -D-galactosid versetzt. Nach 24 stündiger Kultivierung wurden Proben genommen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Pantothenatkonzentration des Überstands wurde mit Hilfe des im Beispiel 6 beschriebenen Pantothenat-tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

D-Pantothenatbildung in verschiedenen C. glutamicum Stämmen	
Stamm	D-Pantothenat (mg/l)
ATCC13032	0,01
ATCC13032/pEKEx2panBC	0,03
ATCC13032 Δ ilvA	0,06
ATCC13032 Δ ilvA/pEKEx2panBC	0,3

Beispiel 9

Produktion von D-Pantothenat mit verschiedenen C. glutamicum Stämmen bei β -Alanin Zugabe

[0049] Zur Quantifizierung der Pantothenatbildung wurden die Stämme ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 und ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) mit 25 mg/l Kanamycin und 3 mg/l Chloramphenicol für 14 Stunden bei 30°C vorkultiviert, zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD₆₀₀ 0,5 betrug. Das Medium enthielt hierbei 2 mM L-Isoleucin, 25 mg/l Kanamycin, 3 mg/l Chloramphenicol und β -Alanin in

einer Endkonzentration von 20 mM. Nach 5 stündiger Kultivierung wurde dem Medium jeweils IPTG (Isopropylthio- β -D-galactosid) in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Nach 49 und 74 Stunden wurde eine Probe entnommen, die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Pantothenatkonzentration des Überstands wurde wie in Beispiel 6 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

D-Pantothenatakkumulation in verschiedenen Stämmen von <i>C. glutamicum</i>		
Stamm	D-Pantothenat [mg/l] nach einer Inkubationszeit von	
	49 Stunden	74 Stunden
ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2	80	100
ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC	920	980

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Weissfrauenstr. 9
- (C) ORT: Frankfurt am Main
- (D) BUNDESLAND: Hessen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-60311

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Leo-Brandt Strasse
- (C) ORT: Juelich
- (D) BUNDESLAND: Nordrhein-Westfalen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-52425

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur
fermentativen Herstellung von D-Pantothenasaeure
unter Verwendung coryneformer Bakterien

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 2164 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRUENGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
- (B) STAMM: ATCC13032

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS

(B) LAGE:351..1163

(D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 351

/EC_number= 4.1.2.12

/product=

"Ketopantoathydroxymethyltransferase"

/gene= "panB"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS

(B) LAGE:1166..2002

(D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 1166

/EC_number= 6.3.2.1

/product= "Pantothenatsynthetase"

/gene= "panC"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCTTCGGGGT ACCAATTCCT TTAAGAACCA TCAGATCAAT CTGTTGTACA TTCTCGGCCA	60
GATTCAGCTT TTCGGTAAGG ACGAAACACT TTCACCTGAA TCGGCAGCAA AGTTTCTTAA	120
AGTTTCTAAG GCAACTGCAA CGAGGTATTT TAGAACTCTC CGAGAAATGG AATTAGTTCA	180
CGAGGTCAGC AAACGCCCTT TCGGGTTTGC GCTCACGGAT AAAGGTCGTG AGATAGTAGG	240
TCTTGAGSTA AAAATTTGAC TCCATAACGA GAACTTAATC GAGCAACACC CCTGAACAGT	300
GAATCAAATC GGAATTTATT TATTCTGAGC TGGTCATCAC ATCTATACTC ATG CCC	356
	Met Pro
	1
ATG TCA GGC ATT GAT GCA AAG AAA ATC CGC ACC CGT CAT TTC CGC GAA	404
Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe Arg Glu	
	5 10 15
GCT AAA GTA AAC GGC CAG AAA GTT TCG GTT CTC ACC AGC TAT GAT GCG	452
Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asp Ala	
	20 25 30
CTT TCG GCG CGC ATT TTT GAT GAG GCT GGC GTC GAT ATG CTC CTT GTT	500
Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu Leu Val	
	35 40 45 50
GGT GAT TCC GCT GCC AAC GTT GTG CTG GGT CGC GAT ACC ACC TTG TCG	548
Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr Leu Ser	
	55 60 65
ATC ACC TTG GAT GAG ATG ATT GTG CTG GCC AAG GCG GTG ACG ATC GCT	596
Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr Ile Ala	
	70 75 80
ACG AAG CGT GCG CTT GTG GTG GTT GAT CTG CCG TTT GGT ACC TAT GAG	644
Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr Tyr Glu	
	85 90 95
GTG AGC CCA AAT CAG GCG GTG GAG TCC GCG ATC CGG GTC ATG CGT GAA	692
Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met Arg Glu	
	100 105 110
ACG GGT GCG GCT GCG GTG AAG ATC GAG GGT GGC GTG GAG ATC GCG CAG	740

EP 1 006 189 A2

	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Gly	Val	Glu	Ile	Ala	Gln	
	115					120					125					130	
5	ACG	ATT	CGA	CGC	ATT	GTT	GAT	GCT	GGA	ATT	CCG	GTT	GTC	GGC	CAC	ATC	788
	Thr	Ile	Arg	Arg	Ile	Val	Asp	Ala	Gly	Ile	Pro	Val	Val	Gly	His	Ile	
					135					140					145		
	GGG	TAC	ACC	CCG	CAG	TCC	GAG	CAT	TCC	TTG	GGC	GGC	CAC	GTG	GTT	CAG	836
	Gly	Tyr	Thr		Gln	Ser	Glu	His	Ser	Leu	Gly	Gly	His	Val	Val	Gln	
10				150					155					160			
	GGT	CGT	GGC	GCG	AGT	TCT	GGA	AAG	CTC	ATC	GCC	GAT	GCC	CGC	GCG	TTG	884
	Gly	Arg	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile	Ala	Asp	Ala	Arg	Ala	Leu	
			165					170					175				
	GAG	CAG	GCG	GGT	GCG	TTT	GCG	GTT	GTG	TTG	GAG	ATG	GTT	CCA	GCA	GAG	932
15	Glu	Gln	Ala	Gly	Ala	Phe	Ala	Val	Val	Leu	Glu	Met	Val	Pro	Ala	Glu	
			180				185					190					
	GCA	GCG	CGC	GAG	GTT	ACC	GAG	GAT	CTT	TCC	ATC	ACC	ACT	ATC	GGA	ATC	980
	Ala	Ala	Arg	Glu	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Ser	Ile	Thr	Thr	Ile	Gly	Ile	
	195					200					205				210		
20	GGT	GCC	GGC	AAT	GGC	ACA	GAT	GGG	CAG	GTT	TTG	GTG	TGG	CAG	GAT	GCC	1028
	Gly	Ala	Gly	Asn	Gly	Thr	Asp	Gly	Gln	Val	Leu	Val	Trp	Gln	Asp	Ala	
				215					220					225			
	TTC	GGC	CTC	AAC	CGC	GGC	AAG	AAG	CCA	CGC	TTC	GTC	CGC	GAG	TAC	GCC	1076
25	Phe	Gly	Leu	Asn	Arg	Gly	Lys	Lys	Pro	Arg	Phe	Val	Arg	Glu	Tyr	Ala	
				230						235							240
	ACC	TTG	GGC	GAT	TCC	TTG	CAC	GAC	GCC	GCG	CAG	GCC	TAC	ATC	GCC	GAT	1124
	Thr	Leu	Gly	Asp	Ser	Leu	His	Asp	Ala	Ala	Gln	Ala	Tyr	Ile	Ala	Asp	
			245					250					255				
30	ATC	CAC	GCG	GGT	ACC	TTC	CCA	GGC	GAA	GCG	GAG	TCC	TTT	TA	ATG	CAG	1171
	Ile	His	Ala	Gly	Thr	Phe	Pro	Gly	Glu	Ala	Glu	Ser	Phe	Met	Gln		
		260				265					270			1			
	GTA	GCA	ACC	ACA	AAG	CAG	GCG	CTT	ATC	GAC	GCC	CTC	CTC	CAC	CAC	AAA	1219
	Val	Ala	Thr	Thr	Lys	Gln	Ala	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Leu	His	His	Lys	
35			5				10					15					
	TCC	GTC	GGG	CTC	GTC	CCC	ACC	ATG	GGT	GCG	CTA	CAC	AGC	GGA	CAC	GCC	1267
	Ser	Val	Gly	Leu	Val	Pro	Thr	Met	Gly	Ala	Leu	His	Ser	Gly	His	Ala	
		20				25					30						
	TCG	TTG	GTT	AAA	GCA	GCA	CGC	GCT	GAA	AAC	GAC	ACT	GTT	GTA	GCC	AGT	1315
40	Ser	Leu	Val	Lys	Ala	Ala	Arg	Ala	Glu	Asn	Asp	Thr	Val	Val	Ala	Ser	
		35			40				45					50			
	ATT	TTT	GTC	AAT	CCC	CTG	CAG	TTT	GAA	GCA	CTC	GGT	GAT	TGC	GAT	GAT	1363
	Ile	Phe	Val	Asn	Pro	Leu	Gln	Phe	Glu	Ala	Leu	Gly	Asp	Cys	Asp	Asp	
				55				60						65			
45	TAC	CGC	AAC	TAT	CCC	CGC	CAA	CTC	GAC	GCC	GAT	TTA	GCA	CTG	CTT	GAA	1411
	Tyr	Arg	Asn	Tyr	Pro	Arg	Gln	Leu	Asp	Ala	Asp	Leu	Ala	Leu	Leu	Glu	
			70				75						80				
	GAG	GCA	GGT	GTG	GAT	ATT	GTG	TTC	GCA	CCC	GAT	GTG	GAG	GAA	ATG	TAC	1459
	Glu	Ala	Gly	Val	Asp	Ile	Val	Phe	Ala	Pro	Asp	Val	Glu	Glu	Met	Tyr	
50			85				90					95					
	CCC	GGT	GGC	TTG	CCA	CTA	GTG	TGG	GCG	CGC	ACC	GGT	TCC	ATC	GGA	ACA	1507
	Pro	Gly	Gly	Leu	Pro	Leu	Val	Trp	Ala	Arg	Thr	Gly	Ser	Ile	Gly	Thr	
		100				105					110						
55																	

EP 1 006 189 A2

AAA TTG GAG GGT GCC AGC AGG CCT GGC CAT TTC GAT GGT GTG GCT ACC 1555
 Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val Ala Thr
 115 120 125 130

5 GTG GTG GCG AAG CTG TTC AAT TTG GTG CGC CCT GAT CGT GCA TAT TTT 1603
 Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala Tyr Phe
 135 140 145

10 GGA CAA AAA GAT GCT CAG CAG GTT GCG GTG ATT CGG CGA TTG GTT GCC 1651
 Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu Val Ala
 150 155 160

GAT CTA GAC ATT CCC GTG GAG ATT CGT CCC GTT CCG ATT ATT CGT GGC 1699
 Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile Arg Gly
 165 170 175

15 GCC GAT GGC TTA GCC GAA TCC AGC CGC AAT CAA CGT CTT TCT GCG GAT 1747
 Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser Ala Asp
 180 185 190

CAG CGA GCG CAA GCT CTG GTG CTG CCG CAG GTG TTG AGT GGG TTG CAG 1795
 Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly Leu Gln
 195 200 205 210

20 CGT CGA AAA GCA GCT GGT GAA GCG CTA GAT ATC CAA GGT GCG CGC GAC 1843
 Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala Arg Asp
 215 220 225

ACC TTG GCC AGC GCC GAC GGC GTG CGC TTG GAT CAC CTG GAA ATT GTC 1891
 Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu Ile Val
 230 235 240

25 GAT CCA GCC ACC CTC GAA CCA TTA GAA ATC GAC GGC CTG CTC ACC CAA 1939
 Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu Thr Gln
 245 250 255

30 CCA GCG TTG GTG GTC GGC GCG ATT TTC GTG GGG CCG GTG CGG TTG ATC 1987
 Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg Leu Ile
 260 265 270

GAC AAT ATC GAG CTC TAGTACCAAC CCTGCGTTGC AGCACGCAGC TTCGCATAAC 2042
 Asp Asn Ile Glu Leu
 275

35 GCGTGCTCAG CTCAGTGTTT TTAGTGCGC GGTGCGGATC GGAACCGGGA GTTGCCCACT 2102
 GCGGTGGCGT GGCCTCACCC GACAGCGCCC ATGCCGCCTG ACGAGCTGCA CCCAACGCCA 2162

CA 2164

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LAENGE: 271 Aminosaeuren
 (B) ART: Aminosaeure
 (D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Pro Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe
 1 5 10 15

50 Arg Glu Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asp Ala Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu

55

EP 1 006 189 A2

35 40 45
 5 Leu Val Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr
 50 55 60
 Leu Ser Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr
 65 70 75 80
 Ile Ala Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr
 85 90 95
 10 Tyr Glu Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met
 100 105 110
 Arg Glu Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile
 115 120 125
 15 Ala Gln Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly
 130 135 140
 His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val
 145 150 155 160
 20 Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg
 165 170 175
 Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro
 180 185 190
 25 Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile
 195 200 205
 Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln
 210 215 220
 Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu
 225 230 235 240
 30 Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile
 245 250 255
 Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe
 260 265 270

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LAENGE: 279 Aminosaeuren
 (B) ART: Aminosaeure
 (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

45

Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His
 1 5 10 15
 50 His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly
 20 25 30
 His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val
 35 40 45
 55 Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys
 50 55 60
 Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu

55

EP 1 006 189 A2

65 70 75 80
 5 Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu
 85 90 95
 Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile
 100 105 110
 10 Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val
 115 120 125
 Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala
 130 135 140
 Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu
 145 150 155 160
 15 Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile
 165 170 175
 Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser
 180 185 190
 20 Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly
 195 200 205
 Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala
 210 215 220
 25 Arg Asp Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu
 225 230 235 240
 Ile Val Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu
 245 250 255
 30 Thr Gln Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg
 260 265 270
 Leu Ile Asp Asn Ile Glu Leu
 275

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LAENGE: 2952 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 40 (ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA
 40 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: NEIN
 45 (vi) URSPRUENGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
 (B) STAMM: ATCC13032
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: MUTANTE R127
 50 (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
 (B) LAGE: 290..2125
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 290
 /EC_number= 4.2.1.9
 /product= "Dihydroxysaeuredehydratase"
 /gene= "ilvD"
 55

EP 1 006 189 A2

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

5	AGTACTTGGA GCGCCAAAAG GCACTGGGCA AGCCAGTTCA GTTGAAC TTC GATGACGACA	60
	CCGATGGGAA TACAACACAA ACAGAAAGCG TTGAATCCCA AGAGACCGGA CAAGCCGCGT	120
	CTGAAACCTC ACATCGTGAT AACCTGCGT CACAGCACTA GAGTGTAATA AGCCGTCCGA	180
	ACCAAAGGTC CACACCTCTG CACGAGTAGA AGCTCACCCA AGTTTTCAAA GTGCCGTTGA	240
10	TTCTTGACAA CCACCCGCCG CTCTTTAGAG CAGATTTGAA AAGCGCATC ATG ATC	295
	Met Ile	
	280	
	CCA CTT CGT TCA AAA GTC ACC ACC GTC GGT CGC AAT GCA GCT GGC GCT	343
15	Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala Ala Gly Ala	
	285 290 295	
	CGC GCC CTT TGG CGT GCC ACC GGC ACC AAG GAA AAT GAG TTC GGC AAG	391
	Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu Phe Gly Lys	
	300 305 310	
	CCA ATT GTT GCC ATC GTA AAC TCC TAC ACC CAG TTC GTG CCC GGA CAC	439
20	Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val Pro Gly His	
	315 320 325	
	GTT CAC CTT AAG AAC GTC GGC GAT ATT GTG GCA GAT GCA GTG CGC AAA	487
	Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala Val Arg Lys	
	330 335 340 345	
25	GCC GGT GGC GTT CCA AAG GAA TTC AAC ACC ATC GTC GAT GAC GGC ATC	535
	Ala Gly Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Val Asp Asp Gly Ile	
	350 355 360	
	GCC ATG GGA CAC GGC GGC ATG CTG TAC TCC CTG CCA TCC CGT GAA ATC	583
30	Ala Met Gly His Gly Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser Arg Glu Ile	
	365 370 375	
	ATC GCC GAC TCC GTC GAA TAC ATG GTC AAC GCA CAC ACC GCC GAC GCC	631
	Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr Ala Asp Ala	
	380 385 390	
	ATG GTG TGT ATC TCC AAC TGT GAC AAG ATC ACC CCA GGC ATG CTC AAC	679
35	Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly Met Leu Asn	
	395 400 405	
	GCA GCA ATG CGC CTG AAC ATC CCA GTG GTC TTC GTT TCC GGT GGC CCA	727
	Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser Gly Gly Pro	
	410 415 420 425	
40	ATG GAA GCT GGC AAG GCT GTC GTC GTT GAG CGC GTT GCA CAC GCA CCA	775
	Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Val Glu Arg Val Ala His Ala Pro	
	430 435 440	
	ACC GAC CTC ATC ACC GCG ATC TCC GCA TCC GCA AGC GAT GCA GTC GAC	823
45	Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp Ala Val Asp	
	445 450 455	
	GAC GCA GGC CTT GCA GCC GTT GAA CGA TCC GCA TGC CCA ACC TGT GGC	871
	Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro Thr Cys Gly	
	460 465 470	
	TCC TGC TCC GGT ATG TTC ACC GCG AAC TCC ATG AAC TGC CTC ACC GAA	919
50	Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys Leu Thr Glu	
	475 480 485	
	GCT CTG GGA CTT TCT CTC CCG GGC AAC GGC TCC ACT CTG GCA ACC CAC	967

55

EP 1 006 189 A2

	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Pro	Gly	Asn	Gly	Ser	Thr	Leu	Ala	Thr	His	
	490					495					500					505	
5	GCA	GCA	CGT	CGC	GCA	CTG	TTT	GAA	AAG	GCC	GGC	GAA	ACC	GTC	GTT	GAA	1015
	Ala	Ala	Arg	Arg	Ala	Leu	Phe	Glu	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Val	Val	Glu	
					510					515					520		
	CTG	TGC	CGC	CGC	TAC	TAC	GGT	GAA	GAA	GAC	GAA	TCC	GTT	CTG	CCA	CGT	1063
	Leu	Cys	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Glu	Asp	Glu	Ser	Val	Leu	Pro	Arg	
					525					530					535		
10	GGC	ATT	GCC	ACC	AAG	AAG	GCA	TTC	GAA	AAC	GCA	ATG	GCA	CTG	GAT	ATG	1111
	Gly	Ile	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala	Phe	Glu	Asn	Ala	Met	Ala	Leu	Asp	Met	
			540					545					550				
	GCC	ATG	GGT	GGA	TCC	ACC	AAC	ACC	ATC	CTC	CAC	ATC	CTC	GCA	GCT	GCC	1159
15	Ala	Met	Gly	Gly	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Leu	His	Ile	Leu	Ala	Ala	Ala	
		555						560					565				
	CAG	GAA	GGC	GAA	GTT	GAC	TTC	GAC	CTC	GCA	GAC	ATC	GAC	GAA	CTG	TCC	1207
	Gln	Glu	Gly	Glu	Val	Asp	Phe	Asp	Leu	Ala	Asp	Ile	Asp	Glu	Leu	Ser	
		570				575					580					585	
20	AAA	AAC	GTC	CCC	TGC	CTG	TCC	AAG	GTT	GCA	CCA	AAC	TCC	GAC	TAC	CAC	1255
	Lys	Asn	Val	Pro	Cys	Leu	Ser	Lys	Val	Ala	Pro	Asn	Ser	Asp	Tyr	His	
					590					595					600		
	ATG	GAA	GAC	GTC	CAC	CGC	GCC	GGT	CGC	ATT	CCA	GCA	CTG	CTC	GGC	GAG	1303
	Met	Glu	Asp	Val	His	Arg	Ala	Gly	Arg	Ile	Pro	Ala	Leu	Leu	Gly	Glu	
				605					610						615		
25	CTC	AAC	CGC	GGT	GGC	CTG	CTG	AAC	AAG	GAC	GTC	CAC	TCC	GTT	CAC	TCC	1351
	Leu	Asn	Arg	Gly	Gly	Leu	Leu	Asn	Lys	Asp	Val	His	Ser	Val	His	Ser	
			620					625						630			
	AAC	GAC	CTT	GAA	GGT	TGG	TTG	GAT	GAC	TGG	GAT	ATC	CGC	TCT	GGC	AAG	1399
30	Asn	Asp	Leu	Glu	Gly	Trp	Leu	Asp	Asp	Trp	Asp	Ile	Arg	Ser	Gly	Lys	
			635						640						645		
	ACC	ACC	GAA	GTA	GCA	ACC	GAA	CTC	TTC	CAC	GCA	GCC	CCA	GGT	GGC	ATC	1447
	Thr	Thr	Glu	Val	Ala	Thr	Glu	Leu	Phe	His	Ala	Ala	Pro	Gly	Gly	Ile	
						655					660					665	
35	CGC	ACC	ACC	GAA	GCA	TTC	TCC	ACC	GAG	AAC	CGC	TGG	GAC	GAA	CTC	GAC	1495
	Arg	Thr	Thr	Glu	Ala	Phe	Ser	Thr	Glu	Asn	Arg	Trp	Asp	Glu	Leu	Asp	
					670					675					680		
	ACC	GAC	GCT	GCC	AAG	GGC	TGC	ATC	CGC	GAC	GTT	GAA	CAC	GCC	TAC	ACC	1543
	Thr	Asp	Ala	Ala	Lys	Gly	Cys	Ile	Arg	Asp	Val	Glu	His	Ala	Tyr	Thr	
				685					690					695			
40	GCC	GAC	GGC	GGC	CTG	GTT	GTT	CTT	CGC	GGC	AAC	ATC	TCC	CCT	GAC	GGC	1591
	Ala	Asp	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Leu	Arg	Gly	Asn	Ile	Ser	Pro	Asp	Gly	
			700					705						710			
	GCA	GTG	ATC	AAG	TCC	GCA	GGT	ATC	GAA	GAA	GAG	CTG	TGG	AAC	TTC	ACC	1639
45	Ala	Val	Ile	Lys	Ser	Ala	Gly	Ile	Glu	Glu	Glu	Leu	Trp	Asn	Phe	Thr	
			715				720						725				
	GGA	CCA	GCA	CGA	GTT	GTC	GAA	AGC	CAG	GAA	GAG	GCA	GTC	TCT	GTC	ATC	1687
	Gly	Pro	Ala	Arg	Val	Val	Glu	Ser	Gln	Glu	Glu	Ala	Val	Ser	Val	Ile	
			730			735					740					745	
	CTG	ACC	AAG	ACC	ATC	CAA	GCT	GGC	GAA	GTT	CTG	GTC	GTC	CGC	TAC	GAA	1735
50	Leu	Thr	Lys	Thr	Ile	Gln	Ala	Gly	Glu	Val	Leu	Val	Val	Arg	Tyr	Glu	
					750					755					760		
	GGC	CCA	TCA	GGT	GGA	CCA	GGC	ATG	CAG	GAA	ATG	CTT	CAC	CCA	ACC	GCA	1783
55																	

EP 1 006 189 A2

	Gly	Pro	Ser	Gly	Gly	Pro	Gly	Met	Gln	Glu	Met	Leu	His	Pro	Thr	Ala	
				765					770					775			
5	TTC	CTC	AAG	GGA	TCC	GGC	CTG	GGC	AAG	AAG	TGT	GCA	CTG	ATC	ACC	GAC	1831
	Phe	Leu	Lys	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Lys	Lys	Cys	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp	
			780					785					790				
	GGC	CGT	TTC	TCC	GGA	GGT	TCC	TCA	GGA	CTG	TCC	ATC	GGC	CAC	GTC	TCC	1879
	Gly	Arg	Phe	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	His	Val	Ser	
			795				800					805					
10	CCA	GAA	GCA	GCA	CAC	GGC	GGA	GTC	ATT	GGT	CTG	ATC	GAA	AAC	GGC	GAC	1927
	Pro	Glu	Ala	Ala	His	Gly	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ile	Glu	Asn	Gly	Asp	
	810					815					820					825	
	ATC	GTC	TCC	ATC	GAC	GTT	CAC	AAC	CGC	AAG	CTC	GAA	GTT	CAG	GTC	TCC	1975
	Ile	Val	Ser	Ile	Asp	Val	His	Asn	Arg	Lys	Leu	Glu	Val	Gln	Val	Ser	
15					830					835					840		
	GAC	GAG	GAA	CTC	CAG	CGC	CGC	CGC	GAC	GCT	ATG	AAC	GCC	TCC	GAG	AAG	2023
	Asp	Glu	Glu	Leu	Gln	Arg	Arg	Arg	Asp	Ala	Met	Asn	Ala	Ser	Glu	Lys	
				845					850				855				
20	CCA	TGG	CAG	CCA	GTC	AAC	CGT	AAC	CGC	GTT	GTC	ACC	AAG	GCA	CTG	CGC	2071
	Pro	Trp	Gln	Pro	Val	Asn	Arg	Asn	Arg	Val	Val	Thr	Lys	Ala	Leu	Arg	
			860					865					870				
	GCA	TAC	GCA	AAG	ATG	GCT	ACC	TCC	GCT	GAT	AAG	GGT	GCA	GTC	CGT	CAG	2119
	Ala	Tyr	Ala	Lys	Met	Ala	Thr	Ser	Ala	Asp	Lys	Gly	Ala	Val	Arg	Gln	
		875					880					885					
25	GTC	GAC	TAACCC	TTTG	TGAGT	GTTTG	AGCAC	CGGT	CCCTACT	TTTG	GGTTCC	GGTG					2175
	Val	Asp															
	890																
	CTTTTTCATG	TCTTGGCCTG	TGTGGGCGTG	GTGGAGCTCC	CCGTTGCAAA	TACTCACCAC											2235
30	AAGTTCGAGG	ATTTCTGCTG	GTTGTGGTGG	ATTTTCCCGC	TTTATAGCCC	TATGCGTGCA											2295
	ACTTTCGGAG	CGATTCCAAA	GGGCAAAGCC	CTGTTTGTGG	TGGATCCTTG	CCCTGGAAGC											2355
	TTTCAGGAAC	CACAACTACC	CCACTGACCC	CAAAGTGGAT	AGGCCCTATT	CTTCCGTTTA											2415
	AGCGCCTCAA	ACACCTCTCC	CCACACTTGA	CCCATTAGGC	AATTACGAAT	CCTTAAACAG											2475
35	CCTTCTACAG	CACCATGCCC	CAAACCGAAC	CCAGGCATGA	AAAAGACCCT	CACCAGGAGG											2535
	GTCTTTTCT	AAAACCTTGG	CTACGCGATT	GGGTTACAC	CCGCACCGAA	CCACCACAGC											2595
	AGAACTGCCG	CTGCGATGCC	GATGACCACG	AAGATCCACG	AGCTCACCAG	TGGACGCTTT											2655
40	GCCCAACCTC	GGCCAGAGTC	AAGGGAAATC	TTGCCGGGGC	CGGTGAAC	TGAGTCCGACA											2715
	ACCACGATAG	TGAGGATCAG	TGCCAGCATC	AATGGCTCAC	TAAGTTCACC	CCAACCACCT											2775
	TCATGAGTGT	TGACTTGGTG	AAGGGTGGTA	AAGGATGTCG	CCACCGTGGC	TACCGCTGCT											2835
45	GCCACTGGGG	TCATCAGACC	AAGGAGCAGG	AAGACACCAG	CCGCAAGTTC	AATAGATGGA											2895
	AGCAGGATCG	CGAGGATTTC	AGGCCACTGG	TAACCAGCGA	ACTCTGCCTC	GACTCTA											2952

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

50 (1) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LAENGE: 612 Aminosaeuren
 (B) ART: Aminosaeure
 (D) TOPOLOGIE: linear

55

EP 1 006 189 A2

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

5	Met	Ile	Pro	Leu	Arg	Ser	Lys	Val	Thr	Thr	Val	Gly	Arg	Asn	Ala	Ala	1	5	10	15
	Gly	Ala	Arg	Ala	Leu	Trp	Arg	Ala	Thr	Gly	Thr	Lys	Glu	Asn	Glu	Phe	20	25	30	
10	Gly	Lys	Pro	Ile	Val	Ala	Ile	Val	Asn	Ser	Tyr	Thr	Gln	Phe	Val	Pro	35	40	45	
	Gly	His	Val	His	Leu	Lys	Asn	Val	Gly	Asp	Ile	Val	Ala	Asp	Ala	Val	50	55	60	
15	Arg	Lys	Ala	Gly	Gly	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Thr	Ile	Val	Asp	Asp	65	70	75	80
	Gly	Ile	Ala	Met	Gly	His	Gly	Gly	Met	Leu	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Arg	85	90	95	
20	Glu	Ile	Ile	Ala	Asp	Ser	Val	Glu	Tyr	Met	Val	Asn	Ala	His	Thr	Ala	100	105	110	
	Asp	Ala	Met	Val	Cys	Ile	Ser	Asn	Cys	Asp	Lys	Ile	Thr	Pro	Gly	Met	115	120	125	
25	Leu	Asn	Ala	Ala	Met	Arg	Leu	Asn	Ile	Pro	Val	Val	Phe	Val	Ser	Gly	130	135	140	
	Gly	Pro	Met	Glu	Ala	Gly	Lys	Ala	Val	Val	Val	Glu	Arg	Val	Ala	His	145	150	155	160
30	Ala	Pro	Thr	Asp	Leu	Ile	Thr	Ala	Ile	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Asp	Ala	165	170	175	
	Val	Asp	Asp	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Ser	Ala	Cys	Pro	Thr	180	185	190	
35	Cys	Gly	Ser	Cys	Ser	Gly	Met	Phe	Thr	Ala	Asn	Ser	Met	Asn	Cys	Leu	195	200	205	
	Thr	Glu	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Pro	Gly	Asn	Gly	Ser	Thr	Leu	Ala	210	215	220	
40	Thr	His	Ala	Ala	Arg	Arg	Ala	Leu	Phe	Glu	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Val	225	230	235	240
	Val	Glu	Leu	Cys	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Glu	Asp	Glu	Ser	Val	Leu	245	250	255	
45	Pro	Arg	Gly	Ile	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala	Phe	Glu	Asn	Ala	Met	Ala	Leu	260	265	270	
	Asp	Met	Ala	Met	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Thr	Ile	Leu	His	Ile	Leu	Ala	275	280	285	
50	Ala	Ala	Gln	Glu	Gly	Glu	Val	Asp	Phe	Asp	Leu	Ala	Asp	Ile	Asp	Glu	290	295	300	
	Leu	Ser	Lys	Asn	Val	Pro	Cys	Leu	Ser	Lys	Val	Ala	Pro	Asn	Ser	Asp	305	310	315	320
55	Tyr	His	Met	Glu	Asp	Val	His	Arg	Ala	Gly	Arg	Ile	Pro	Ala	Leu	Leu	325	330	335	
	Gly	Glu	Leu	Asn	Arg	Gly	Gly	Leu	Leu	Asn	Lys	Asp	Val	His	Ser	Val				

	340	345	350
5	His Ser Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg Ser 355 360 365		
	Gly Lys Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro Gly 370 375 380		
10	Gly Ile Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp Glu 385 390 395 400		
	Leu Asp Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His Ala 405 410 415		
15	Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser Pro 420 425 430		
	Asp Gly Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Glu Leu Trp Asn 435 440 445		
20	Phe Thr Gly Pro Ala Arg Val Val Glu Ser Gln Glu Glu Ala Val Ser 450 455 460		
	Val Ile Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val Arg 465 470 475 480		
25	Tyr Glu Gly Pro Ser Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu His Pro 485 490 495		
	Thr Ala Phe Leu Lys Gly Ser Gly Leu Gly Lys Lys Cys Ala Leu Ile 500 505 510		
30	Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ile Gly His 515 520 525		
	Val Ser Pro Glu Ala Ala His Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Glu Asn 530 535 540		
35	Gly Asp Ile Val Ser Ile Asp Val His Asn Arg Lys Leu Glu Val Gln 545 550 555 560		
	Val Ser Asp Glu Glu Leu Gln Arg Arg Arg Asp Ala Met Asn Ala Ser 565 570 575		
40	Glu Lys Pro Trp Gln Pro Val Asn Arg Asn Arg Val Val Thr Lys Ala 580 585 590		
	Leu Arg Ala Tyr Ala Lys Met Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala Val 595 600 605		
45	Arg Gln Val Asp 610		

50

Abbildungen

[0050] Folgende Abbildungen sind beigefügt:

55

Abbildung 1:

Restriktionskartierung von pUR1 und Lage des sequenzierten Fragments.

Abbildung 2:
Restriktionskarte des Plasmids pEKEx2panBC.

Abbildung 3:
5 Restriktionskarte des Plasmids pECM3ilvBNCD.

Patentansprüche

1. In Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft Corynebacterium, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:
10
a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
b) codierend für das panC-Gen (Pantothensynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls
15 c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4.
2. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 1 mit:
20 (i) den Nucleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No.1, SEQ-ID-No.4,
(ii) mindestens einer dieser Sequenzen, die den jeweiligen Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entsprechen oder
25 (iii) mindestens einer dieser Sequenzen, die mit den zu jeweiligen Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisieren und gegebenenfalls.
(iiii) funktionsneutralen Sinnmutationen in i).
3. Mikroorganismen, insbesondere der Gattung Corynebacterium, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2.
30
4. Pendelvektor (shuttle vector) pECM3ilvBNCD, **gekennzeichnet**
35 durch die in der Abb. 3 wiedergegebene Restriktionskarte, hinterlegt als E.coli DH5 α mcr/pECM3ilvBNCD unter der Bezeichnung DSM 12457.
5. Pendelvektor (shuttle vector) pEKEx2panBC, **gekennzeichnet**
40 durch die in der Abb.2 wiedergegebene Restriktionskarte, hinterlegt als E.coli DH5 α mcr/pEKEx2panBC unter der Bezeichnung DSM 12456.
- 45 6. Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure, **dadurch gekennzeichnet**,
daß man in den Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium das panB- und panC-Gen und gegebenenfalls weitere für die entsprechenden Enzyme codierenden Nucleotidsequenzen verstärkt (überexprimiert) und
50 diese Mikroorganismen zur Fermentation einsetzt.
7. Verfahren zur Herstellung gemäß Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**,
55 daß man zusätzlich das ilvD-Gen verstärkt (überexprimiert).
8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**,

daß man zusätzlich die Gene ilvBNCD verstärkt (überexprimiert).

9. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

5

daß man zur Erzielung der Verstärkung die Kopienzahl der Gene bzw. Nucleotidsequenzen in den Mikroorganismen durch Transformation mit diesen Gene bzw. Nucleotidsequenzen tragenden Plasmidvektoren erhöht.

10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

10

daß man zur Erzielung der Verstärkung die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und Regulationsregion mutiert.

11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

15

daß man zur Erzielung der Verstärkung stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.

12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

20

daß man zur Erzielung der Verstärkung die Lebensdauer der mRNA, die von den oben genannten Sequenzen als Matrize abgelesen wird, verlängert und/oder den Abbau der (des) entsprechenden Enzymproteins(e) verhindert.

25

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,

30

daß man die Gene gemäß Anspruch 1 in Corynebakterien überexprimiert, die weitere Metabolit- bzw. Antimetabolit-Resistenzmutationen aufweisen.

14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,

35

daß man zur Erzielung der Überexpression das Kulturmedium und/oder die Fermentationsführung ändert.

15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,

40

daß man zumindest einen der Stoffwechselwege in den Mikroorganismen ausgeschaltet, die die Pantothenat-(Pantothensäure)-bildung verringern.

16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,

45

daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich zu einem oder mehreren der Gene die übrigen Gene des Stoffwechselweges der Pantothensäurebildung, einzeln oder gemeinsam, überexprimiert.

17. Verfahren gemäß Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,

50

daß man im Stoffwechselweg das ilvA-Gen ausschaltet.

18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,

55

daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt, die den Pendelvektor pECM3ilvBNCD ent-

halten.

19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,

5

daß man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* einsetzt, die den Pendelvektor pEKEx2panBC enthalten.

20. Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure durch Fermentation von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man

10

15

- a) zumindest eines der Gene panB oder panC, bevorzugt panBC, gegebenenfalls in Kombination mit dem *ilvD*-Gen, verstärkt (überexprimiert), und
- b) die Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen anreichert, und
- c) die Pantothensäure isoliert.

21. Verfahren gemäß den Ansprüchen 19 und 20,
dadurch gekennzeichnet,

20

daß man während der Fermentation eine Vorstufe der Pantothensäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoat oder Pantoat.

25

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1

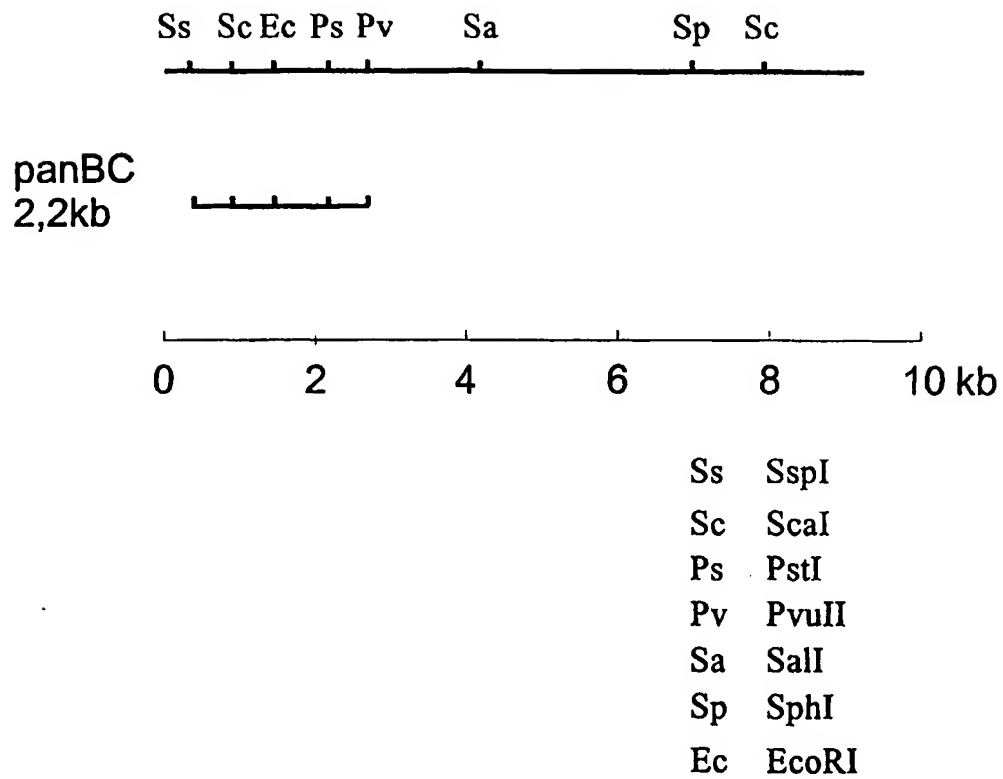


Abbildung 2

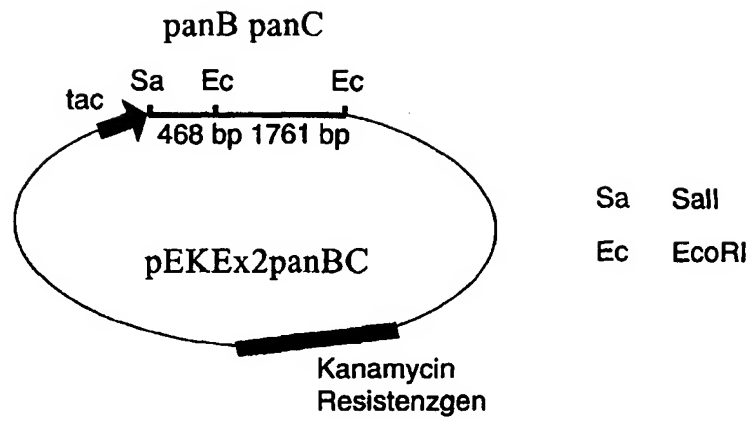
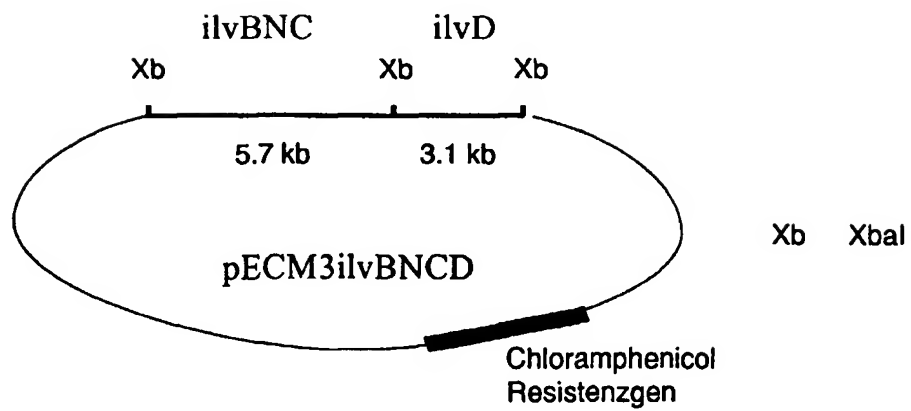


Abbildung 3



(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 006 189 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
17.09.2003 Patentblatt 2003/38

(43) Veröffentlichungstag A2:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(21) Anmeldenummer: 99123738.9

(22) Anmeldetag: 30.11.1999

(51) Int Cl.7: **C12N 15/52**, C12N 15/54,
C12N 15/60, C12N 15/77,
C12P 13/02, C12N 9/00,
C12N 9/10, C12N 9/88,
C12R 1/15
// C12N1/21,(C12R1/15, 1:19)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855312

(71) Anmelder:
• Degussa AG
40474 Düsseldorf (DE)

• Forschungszentrum Jülich GmbH
52425 Jülich (DE)

(72) Erfinder:
• Eggeling, Lothar, Dr.
52428 Jülich (DE)
• Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)
• Sahm, Herrmann, Prof.Dr.
52428 Jülich (DE)

(54) **Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer Bakterien**

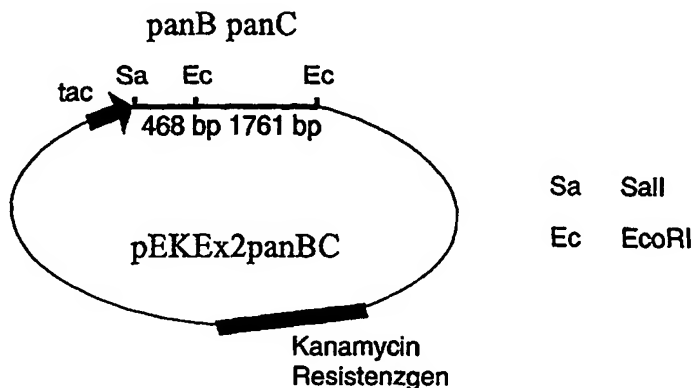
(57) Die Erfindung betrifft in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No. 1,

b) codierend für das panC-Gen (Pantothensynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4,

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*, in denen die genannten Gene verstärkt werden.

Abbildung 2



EP 1 006 189 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 12 3738

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	EP 0 590 857 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 6. April 1994 (1994-04-06) * Zusammenfassung; Ansprüche * * Seite 13, Zeile 53 - Seite 14, Zeile 9 * ---	1-3,6, 9-16,20, 21	C12N15/52 C12N15/54 C12N15/60 C12N15/77 C12P13/02 C12N9/00 C12N9/10 C12N9/88 C12R1/15 //C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)
X	US 5 518 906 A (HIKICHI YUICHI ET AL) 21. Mai 1996 (1996-05-21) * Zusammenfassung; Ansprüche * * Spalte 8, Zeile 21 - Zeile 47 * * Spalte 14, Zeile 11 - Zeile 15 * ---	1-3,6, 9-16,20, 21	
P,X	SAHM HERMANN ET AL: "D-pantothenate synthesis in Corynebacterium glutamicum and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 65, Nr. 5, Mai 1999 (1999-05), Seiten 1973-1979, XP002138605 ISSN: 0099-2240 * das ganze Dokument * ---	1-21	
E	EP 1 006 192 A (DEGUSSA) 7. Juni 2000 (2000-06-07) SEQ ID N°3 * Seite 15 - Seite 18; Beispiel 2 * ---	1-21	
E	WO 01 00843 A (BASF AG) 4. Januar 2001 (2001-01-04) SEQ ID N°613, 615, 279, 281, 617 * Seite 1028 - Seite 1029; Anspruch 3 * * Seite 1030 - Seite 1031 * * Seite 565 - Seite 566 * * Seite 1032 - Seite 1034 * * Seite 567 - Seite 568 * ---	1-5	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 29. Juli 2003	Prüfer Pilat, D
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.02 (P04C03)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 12 3738

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
E	WD 00 50624 A (EGGELING LOTHAR ;SAHM HERMANN (DE); KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH () 31. August 2000 (2000-08-31) * Seite 3, Zeile 1 - Zeile 9 * * Seite 9, Zeile 23 - Zeile 27 * * Ansprüche * -----	1-5	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 29. Juli 2003	Prüfer Pilat, D
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 (01.82) (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 12 3738

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

29-07-2003

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0590857 A	06-04-1994	CN 1095105 A ,B	16-11-1994
		CN 1225394 A ,B	11-08-1999
		CN 1225388 A	11-08-1999
		CN 1225392 A	11-08-1999
		CN 1225358 A ,B	11-08-1999
		EP 0590857 A2	06-04-1994
		JP 6261772 A	20-09-1994
		US 5518906 A	21-05-1996
US 5518906 A	21-05-1996	CN 1095105 A ,B	16-11-1994
		CN 1225394 A ,B	11-08-1999
		CN 1225388 A	11-08-1999
		CN 1225392 A	11-08-1999
		CN 1225358 A ,B	11-08-1999
		EP 0590857 A2	06-04-1994
		JP 6261772 A	20-09-1994
EP 1006192 A	07-06-2000	DE 19855313 A1	08-06-2000
		BR 9905776 A	24-04-2001
		CN 1256314 A	14-06-2000
		EP 1006192 A2	07-06-2000
		HU 9904447 A2	28-11-2000
		JP 2000228990 A	22-08-2000
		KR 2000047829 A	25-07-2000
		SK 163399 A3	11-07-2000
		US 6184007 B1	06-02-2001
		ZA 9907406 A	08-06-2000
WO 0100843 A	04-01-2001	AU 5421300 A	31-01-2001
		BR 0011806 A	14-05-2002
		CA 2383865 A1	04-01-2001
		CN 1371417 T	25-09-2002
		EP 1257649 A2	20-11-2002
		ES 2177475 T1	16-12-2002
		WO 0100843 A2	04-01-2001
		SK 18862001 A3	06-11-2002
		TR 200103707 T2	23-09-2002
		AU 5559000 A	31-01-2001
		BR 0011805 A	14-05-2002
		CA 2383875 A1	04-01-2001
		CN 1370235 T	18-09-2002
		EP 1263963 A2	11-12-2002
		ES 2178979 T1	16-01-2003
		WO 0100844 A2	04-01-2001
		JP 2003517291 T	27-05-2003
		SK 18872001 A3	03-12-2002

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 12 3738

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

29-07-2003

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0100843 A		TR 200103706 T2	21-10-2002
		US 2003049804 A1	13-03-2003
		AU 5836900 A	31-01-2001
		BR 0011811 A	18-06-2002
		CA 2380870 A1	04-01-2001
		EP 1290178 A2	12-03-2003
		ES 2184658 T1	16-04-2003
		HU 0203340 A2	28-01-2003
		WO 0100804 A2	04-01-2001
		SK 18882001 A3	10-09-2002
		TR 200103709 T2	21-08-2002
		AU 5421600 A	31-01-2001
		BR 0011810 A	07-05-2002
		CA 2380863 A1	04-01-2001
		CN 1370236 T	18-09-2002
		EP 1255839 A2	13-11-2002
		ES 2177476 T1	16-12-2002
		WO 0100805 A2	04-01-2001
		SK 18912001 A3	08-10-2002
		TR 200103708 T2	21-08-2002
		AU 5420500 A	31-01-2001
		BR 0011803 A	09-04-2002
		CA 2380871 A1	04-01-2001
		CN 1370234 T	18-09-2002
		EP 1254232 A2	06-11-2002
		ES 2176128 T1	01-12-2002
		HU 0203647 A2	28-01-2003
		WO 0100842 A2	04-01-2001
		SK 18902001 A3	10-09-2002
		TR 200103711 T2	22-07-2002
WO 0050624 A	31-08-2000	DE 19907567 A1	24-08-2000
		AT 236991 T	15-04-2003
		CZ 20013037 A3	16-01-2002
		DE 50001708 D1	15-05-2003
		WO 0050624 A1	31-08-2000
		EP 1155139 A1	21-11-2001
		JP 2002537771 A	12-11-2002
		SK 12052001 A3	07-01-2002

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82